基础研究

RNA干扰特异性阻断胰岛局部血管紧张素II 1型受体对第一相胰岛素分泌的影响

易秋艳[1],刘艳清[2],张 珍[2],刘春燕[1],卢 斌[1],邵加庆[1]

[1]南京大学医学院临床学院南京军区南京总医院内分泌科,江苏 南京 210002;[2]南方医科大学南京临床学院南京军区南京总医院内分泌科,江苏 南京 210002

摘要:目的 观察RNA干扰技术阻断胰岛局部血管紧张素II 1型受体(AT1R)表达后db/db小鼠胰岛第一相胰岛素分泌的变化并探讨其潜在机制。**方法** 分离db/db和db/m小鼠的胰岛并检测AT1R mRNA和蛋白的表达。构建针对小鼠AT1R基因的RNA干扰重组腺病毒(Ad-siAT1R)及含对照序列的重组腺病毒(Ad-siControl)。将分离培养的db/db小鼠胰岛细胞分为三组:Ad-siAT1R感染组、Ad-siControl感染组、空白对照组。腺病毒感染后继续培养胰岛细胞72 h。检测各组AT1R、GLUT-2及葡萄糖激酶(GCK)的表达,并用胰岛灌流系统检测胰岛素动态分泌。**结果** db/db小鼠胰岛中AT1R mRNA和蛋白表达水平比db/m小鼠胰岛高2倍左右(P<0.05)。腺病毒感染后,Ad-siAT1R组较Ad-siControl组胰岛AT1R mRNA表达水平下降75%,蛋白表达水平下降65%,而GLUT-2及GCK表达水平分别升高190%、121%(均P<0.05)。胰岛灌流显示:空白对照组和Ad-siControl组小鼠的胰岛素第一相分泌显著下降,仅为基础水平的1.8倍;而Ad-siAT1R组在高糖负荷后1~2 min即达到最高峰值140 mU/L,为基础水平的2.8倍,表明第一相胰岛素分泌明显改善。**结论** RNA干扰特异性阻断胰岛局部AT1R表达可上调GLUT-2及GCK表达,恢复第一相胰岛素分泌,这可能是AT1R阻滞剂改善胰岛分泌功能的机制之一。

关键词:RNA干扰;肾素-血管紧张素系统;血管紧张素II 1型受体;第一相胰岛素分泌

Effect of small interfering RNA-mediated angiotensin II type 1 receptor knockdown on first-phase insulin secretion in isolated diabetic rat islets

YI Qiuyan[1], LIU Yanqing[2], ZHANG Zhen[2], LIU Chunyan[1], LU Bin[1], SHAO Jiaqing[1]

[1]Department of Endocrinology, Nanjing Clinical Institute of Nanjing University, Nanjing 210002, China; [2]Department of Endocrinology, Nanjing Clinical Institute of Southern Medical University, Nanjing 210002, China

Abstract: Objective To investigate the effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) knockdown on the first-phase insulin secretion in isolated islets of db/db mice and explore the possible mechanisms. **Methods** Islets were isolated from db/db and db/m mice and the expression level of AT1R in the islets was assayed. A recombinant adenovirus containing siRNA targeting AT1R (Ad-siAT1R) and a recombinant adenovirus with nonspecific siRNA (Ad-siControl) were constructed to infect the isolated islets for 72 h. AT1R, GLUT-2, and GCK expressions in the islets were investigated and islet perifusion was performed to evaluate the kinetics of insulin release. **Results** The expression level of AT1R in the isolated islets from db/db mice was twice that of islets from db/m mice. The islets treated with Ad-siAT1R showed significantly decreased AT1R mRNA and protein levels and significantly increased expression of GLUT-2 (by 190%) and GCK (by 121%) compared to those treated with Ad-siControl (P<0.05). In response to stimulation with 16.7 mmol/L glucose, the first-phase insulin secretion was impaired in both Ad-siControl group and mock infected group with the peak insulin levels only 1.8 times of the basal level; the first-phase insulin secretion was markedly improved in islets treated with Ad-siAT1R, with a peak insulin level reaching 2.8 times of the basal level. **Conclusions** In isolated islets of db/db mice, selective AT1R inhibition can restore the first phase insulin secretion by up-regulating GLUT-2 and GCK, which may be one of the potential mechanisms by which AT1R blockers improve insulin secretion function.

Key words: RNA interference; rennin-angiotensin system; angiotensin II type 1 receptor; first-phase insulin secretion

T2DM患者在疾病早期就已存在胰岛β细胞功能受损,第一相胰岛素分泌障碍是其最早表现。改善胰岛素第一时相分泌可更好控制餐后血糖,减轻血糖波动,保护胰岛β细胞功能,减少糖尿病并发症的发生[1-2]。近年研究证实长期AT1R阻滞剂在体干预能减轻胰岛内氧化应激水平,增加胰岛内微血管数量和局部血流量,升高氧分压,从而改善第一相胰岛素分泌[3-4]。我们前期研究发现坎地沙坦治疗减轻了胰岛β细胞含量的丢失,较大程度地改善了db/db糖尿病小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素分泌,但无法确定这些保护作用是源于胰岛局部

收稿日期:2014-12-22

基金项目:国家自然科学基金(81471018);江苏省医学重点人才项目(RC2011138);江苏省自然科学基金(BK2012781)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81471018).

作者简介:易秋艳,硕士研究生,E-mail: 357660675@qq.com

通信作者:邵加庆,博士,主任医师,副教授,硕士生导师,E-mail: shaojiaq@hotmail.com

RAS阻断还是全身RAS阻断[5]。本研究采用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术抑制胰岛局部AT1R表达,观察其对第一相胰岛素分泌的影响,并探讨可能的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料

10只8周龄清洁级雌性C57BL/KsJ-db/db糖尿病小鼠及5只同周龄同窝出生的C57BL/KsJ-db/m非糖尿病小鼠(合格证号SCXX(苏)2007-0012)。总RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒、PCR引物合成(美国Invitrogen公司)。pSilencer 2.0载体购于美国Ambion公司。重组缺陷型腺病毒质粒pAdEasy-1系统、穿梭载体pAdTrack、BJ5183-AD-1感受态细菌、大肠杆菌Ecoli DH5a、空载腺病毒(Ad-siControl)以及包装细胞购于中科院上海细胞研究所。真核表达质粒pGCsi-U6-shRNA-ATIR由上海吉凯生物公司定制合成。小鼠抗AT1R抗体、GLUT-2抗体、GCK抗体、小鼠抗β-actin抗体、辣根过氧化物酶耦联山羊抗小鼠IgG抗体(美国Santa Cruz公司)。小鼠胰岛素ELISA试剂盒(Morinaga, Yokohama, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 胰岛细胞的分离培养　将db/db和db/m小鼠依次苯巴比妥麻醉后夹闭胆总管十二指肠乳头开口,体视显微镜下行胆总管穿刺后注射1 mg/ml浓度的Ⅳ型胶原酶2 ml,逆行进入胰管使胰腺膨大后迅速分离胰腺,将胰腺置于含Ⅳ型胶原酶1 mg/ml的Hank's平衡液中消化40 min,去除胶原成份后多次振荡洗涤,显微镜下成功分离胰岛,镜下手检胰岛,每孔50个胰岛,每组所获得胰岛至少5孔,置于装有Hank's平衡液24孔板中于37 ℃、5% CO_2恒温箱孵育备用。

1.2.2 RT-PCR检测AT1R mRNA表达　用TRIzol试剂抽提两组胰岛细胞总RNA,参照逆转录试剂盒说明书逆转录为cDNA。AT1R上游引物5'-AGCTACAACA AGGCAAGG-3', 下游引物3'-TAGAAGGCACAGTC GAGG-5'; 内参基因β-actin上游引物5'-TGTTGTCCC TGTATGCCTCTG行GTC-3', 下游引物3'-ATGTCAC GCACGATTTCCCTCTCA-5'。扩增条件:94°C预变性10 min, 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共40个循环, 72 ℃ 7 min。取PCR产物于2%琼脂糖行凝胶电泳,用BIORAD Flour-S MuiltiImager凝胶成像仪扫描并保存,并用凝胶成像分析系统测定灰度值,结果以AT1R条带密度占β-actin条带密度的百分率表示。

1.2.3 INS-1细胞培养　INS-1细胞培养于RPMI 1640培养基中,加入10%(w/v)胎牛血清(GIBCO, Grand Island, NY)、11.1mmol/L葡萄糖、10 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L丙酮酸钠以及50 μmmol/L β-巯基乙醇, 5% CO_2/95%空气的37 ℃孵箱中培养,并每隔1~2 d换1次培养液,每周按1∶3传代。在转染前两天将细胞接种入75 cm^2无菌细胞培养瓶中,细胞浓度为每瓶$4×10^6$个,当培养瓶中的细胞60%~70%汇合时进行转染。

1.2.4 shRNA的设计与筛选　根据GenBank中小鼠AT1R基因(基因序列号:NM-030985)的核苷酸序列,按照美国Ambion公司的网上设计软件设计产生3对shRNA序列,同时设计一对不针对靶基因对照序列siControl。从5'-3'末端,整个shRNA序列为*Bam*HⅠ酶切位点、19 nt正义序列、9 nt loop接头序列、19 nt反义序列、RNA聚合酶Ⅲ终止子(TTT TTT)和*Hin*dⅢ酶切位点。分别合成并纯化每对编码shRNA及siControl的DNA模板单链,退火形成双链DNA,用T_4 DNA连接酶分别连接至pSilencer 2.0载体,利用阳离子脂质体转染至INS-1细胞,每5 μg DNA转染$6×10^6$个细胞。转染3 d后,检测INS-1细胞RNA和蛋白表达。最后选定的siAT1R针对的靶基因序列的5'末端相对于起始密码子对应于小鼠AT1R核苷酸540(GCGTCTTTCTTCTCAATCT)。

1.2.5 重组腺病毒的构建　由生物公司合成针对小鼠AT1R mRNA的特异性siRNA真核表达质粒psiRNA-AT1R;双酶切得到siRNA-AT1R表达片段;插入穿梭载体pAdTrack上,获得转移质粒pAdTrack-siRNA-AT1R;后者经线性化后,转化含有腺病毒骨架质粒pAdEasy-1的大肠杆菌BJ5183进行同源重组;*Pac*Ⅰ酶切鉴定,筛选出正确重组腺病毒质粒pAdEasy-siRNA-AT1R;酶切线性化后转染293细胞包装成重组病毒Ad-siAT1R,荧光显微镜观察绿色荧光表达,行PCR鉴定。通过反复感染扩增病毒,采用氯化铯密度梯度离心法纯化重组腺病毒。以同样方法扩增空载病毒Ad-siControl至相当量,并纯化。获得约$3.6×10^9$ pfu/ml滴度的重组腺病毒Ad-siAT1R和$2.9×10^9$ pfu/ml滴度的空载病毒Ad-siControl。

1.2.6 腺病毒感染胰岛细胞　db/db小鼠胰岛过夜培养24 h后分为3组处理:(1)Ad-siAT1R感染组:按MOI为100(每个胰岛按含2000个细胞计算),将Ad-siAT1R病毒液加入胰岛细胞,隔30 min轻轻晃动,共计20 h;(2)Ad-siControl感染组:按照前述方法,用Ad-siControl病毒液感染胰岛细胞;(3)空白对照组:同等条件下培养未行任何干预处理的胰岛细胞。将病毒液从胰岛细胞移除后,继续培养72 h,每24 h换1次培养液。检测各组葡萄糖刺激的胰岛素分泌(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)水平,随后收集各组胰岛,检测各组AT1R, GLUT-2,以及GCK的表达。

1.2.7 胰岛灌流　将离体胰岛灌流系统置于37 ℃水浴,并将微量泵输注系统与其连接。将预先配置好

的含2.8 mmoL/L葡萄糖的KRB溶液(129 mmol/L NaCl,5 mmol/L $NaHCO_3$,4.8 mmol/L KCl,1.2 mmol/L KH_2PO_4, 1.2 mmol/L $MgSO_4$, 0.2% BSA, 10 mmol/L Hepes,2.5 mmoL/L $CaCl_2$,2.8 mmol/L葡萄糖,pH 7.4)充填至整个管道系统,在层析柱中加入100 μl预先配置好的葡聚糖凝胶,静置5 min,然后将每组50个胰岛转移至层析柱,静置5 min,再加入100 μl葡聚糖凝胶,盖紧硅胶塞密闭胰岛舱,然后将胰岛舱包括整个管道系统全部浸入37 ℃水浴。连接微量泵,开始2.8 mmol/L KRB 0.5 ml/h速度灌流1 h,后换为16.7 mmol/L KRB 1 ml/h。以开始16.7 mmol/L KRB灌流为0时间点,在灌流前30、20、10 min和灌流后0、20、40、60、80、100 s以及2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30 min时收集灌流出的液体,−80 ℃保存,胰岛素测定使用小鼠胰岛素ELISA试剂盒,胰高血糖素测定使用小鼠胰高血糖素ELISA试剂盒,根据测得的浓度绘制其动态分泌曲线。

1.2.8 Western blot检测各组胰岛AT1R,GLUT-2,以及GCK的表达 按公司说明操作步骤抽提各组细胞蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度。取50 μg蛋白用于SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至NC膜,BSA室温封闭1 h,TBST溶液洗膜3次,每次5 min,用到的抗体主要有小鼠抗AT1R抗体、抗GCK抗体及抗GLUT-2抗体,4℃抗孵育过夜,同前法洗膜3次,室温下相应加入辣根过氧化物酶耦联山羊抗小鼠IgG抗体(1:2000)孵育2 h。用增强化学发光法显色,X片曝光显影,同时用同样方法对上述样品用抗鼠的β-actin单克隆抗体免疫杂交与显色作为内参对照,凝胶成像分析系统摄像分析。

1.3 统计学分析

所有数值均表示为均数±标准差。所有统计分析均使SPSS11.0软件。组间比较采用独立t检验或单因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 db/db和db/m小鼠胰岛AT1R、GLUT-2,以及GCK的表达

与db/m小鼠相比,db/db小鼠胰岛AT1R mRNA及蛋白的表达水平升高2倍左右,差异有统计学意义($P<0.05$,图1);而GLUT-2和GCK表达水平分别下降65.8%和62.7%(图2),差异均有统计学意义($P<0.05$),提示db/db小鼠AT1R存在过度表达,而GLUT-2和GCK表达明显受损。

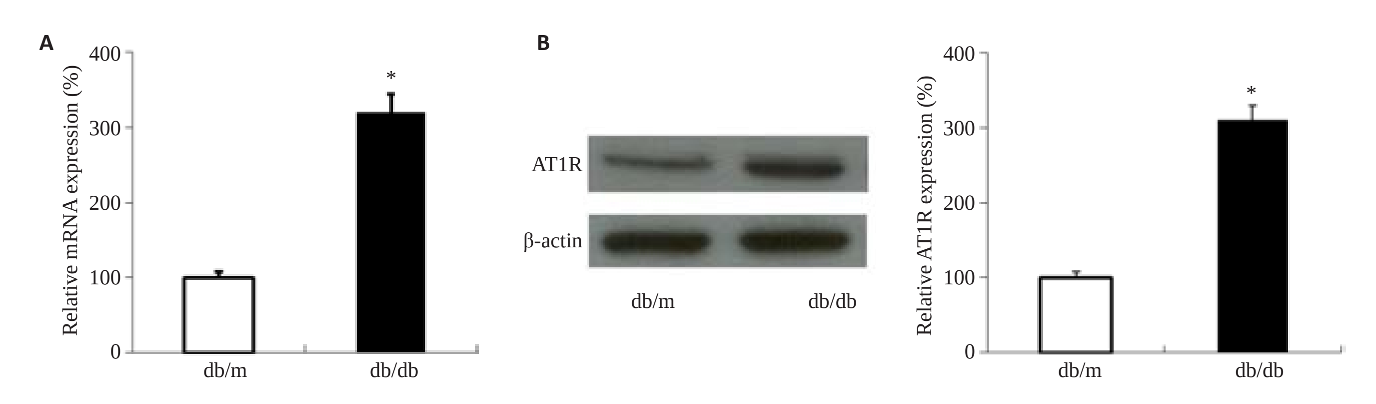


图1 db/m小鼠和db/db小鼠胰岛AT1R的表达

Fig.1 Expression levels of AT1R mRNA (*A*) and protein (*B*) in islets of db/m mice and db/db mice. *$P<0.05$ *vs* db/m group.

2.2 腺病毒感染后各组小鼠胰岛AT1R、GLUT-2,以及GCK的表达

腺病毒感染后,Ad-siControl组和空白对照组之间AT1R的表达差异无统计学意义。Ad-siAT1R组AT1R mRNA表达水平较Ad-siControl组下降75%,蛋白表达水平下降65%,差异有统计学意义($P<0.05$),表明RNA特异性干扰成功抑制了胰岛局部AT1R表达(图3)。与此同时,Ad-siAT1R组GLUT-2和GCK表达水平较Ad-siControl组分别升高190%和121%(均$P<0.05$),提示db/db小鼠胰岛AT1R表达水平下调后,胰岛β细胞的GLUT-2和GCK表达明显升高(图4)。

2.3 胰岛素动态分泌

低糖灌流时,各组小鼠体外胰岛的胰岛素分泌水平无明显差异。高糖刺激后,空白对照组和Ad-siControl组的胰岛素分泌水平均出现一定程度升高,最高峰值90 mU/L左右,仅达到基础水平1.8倍。而Ad-siAT1R组的胰岛素分泌在给予16.7 mmol/L葡萄糖后1~2 min即达到最高峰值140 mU/L,为基础水平的2.8倍,与Ad-siControl组相比差异有统计学意义(均$P<0.05$),表明RNA干扰特异性抑制胰岛局部AT1R表达后,db/db小鼠胰岛的第一相胰岛素分泌显著改善(图5)。

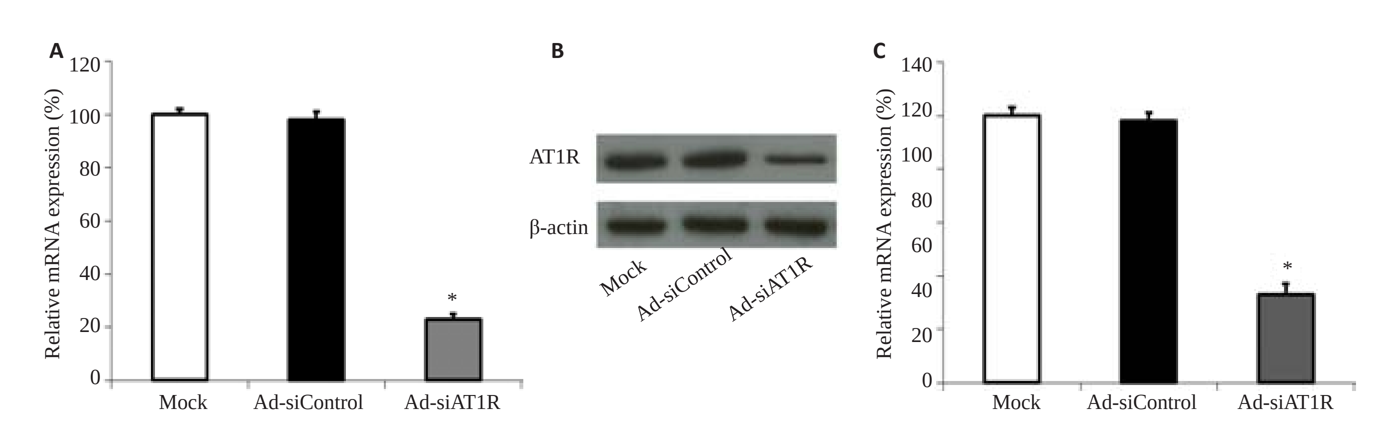


图2 AT1R基因沉默对AT1R表达的影响

Fig.2 Effects of AT1R silencing on AT1R expression. *A*: AT1R mRNA expression in islets of db/db mice transfected with Ad-si AT1R, Ad-siControl, or Mock (*P<0.05 *vs* Ad-siControl); *B*: Western blotting result of AT1R protein; *C*: AT1R protein expression in islets of db/ db mice transfected with Ad-si AT1R, Ad-siControl, or Mock (*P<0.05 *vs* Ad-siControl).

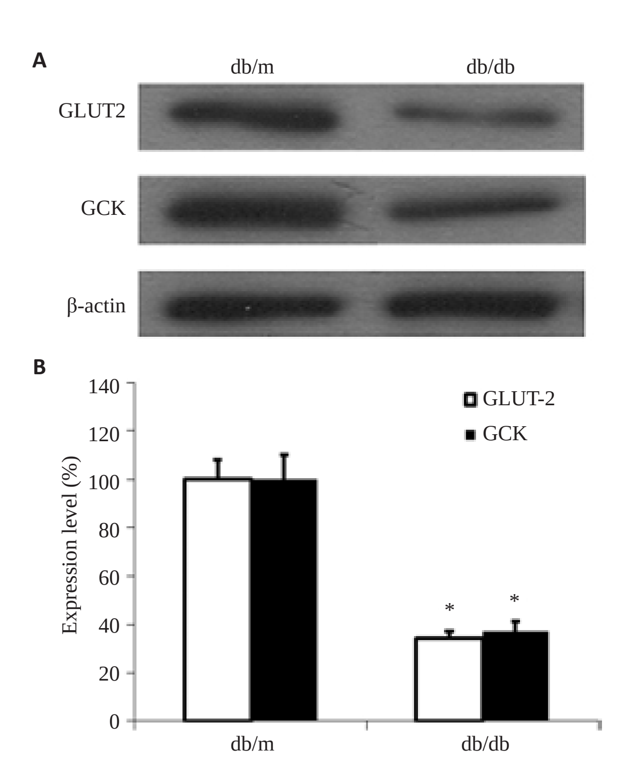
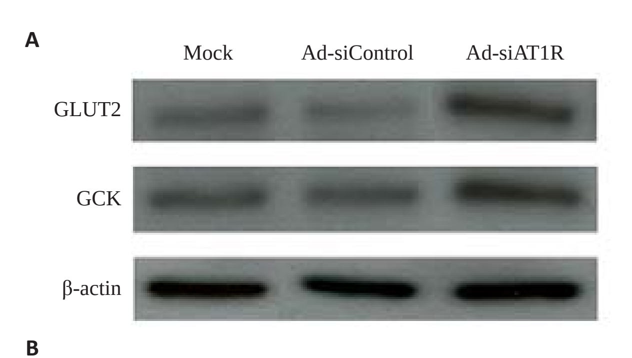


图3 db/m小鼠和db/db小鼠离体胰岛GLUT-2和GCK的表达

Fig.3 Expression of GLUT-2 and GCK protein in islets of db/m mice and db/db mice. *P<0.05 *vs* db/m group. *A*: Western blotting; *B*: GLUT-2 and GCK protein expression in islets of db/ db mice and db/db mice (*P<0.05 *vs* db/m group).



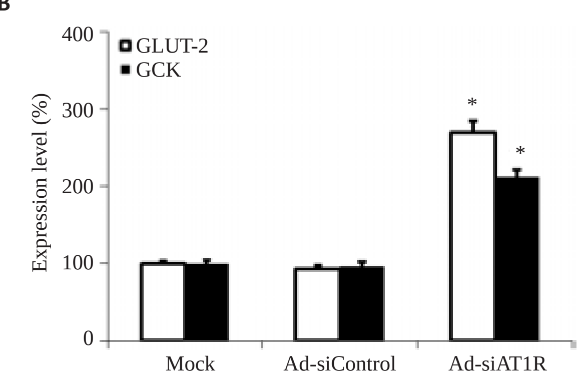


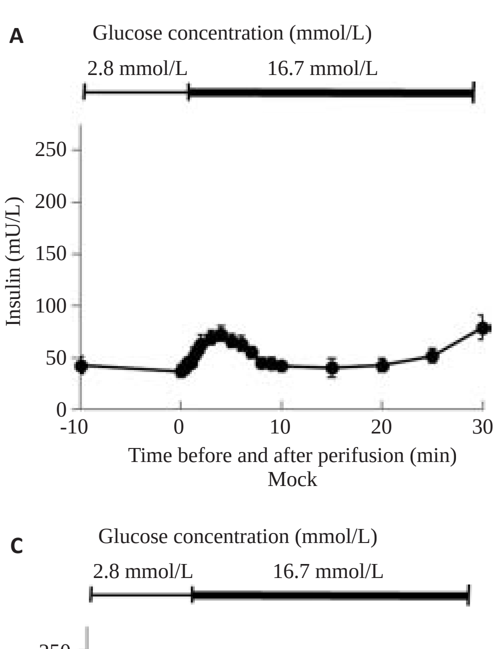
图4 AT1R基因沉默对GLUT-2和GCK表达的影响

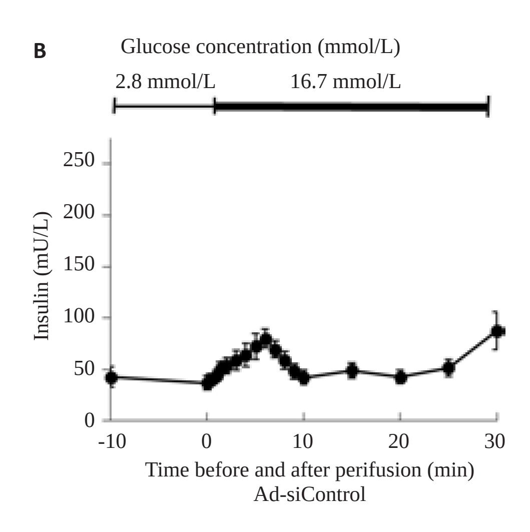
Fig.4 Effects of AT1R silencing on GLUT-2 and GCK expression. *A*: Western blotting; *B*: GLUT-2 and GCK protein expression in islets of db/db mice transfected with Ad-siAT1R, Ad-siControl, or Mock (*P<0.05 *vs* Ad-siControl group).

3 讨论

近年研究发现胰岛局部存在独立的RAS系统，血管紧张素II(angiotensin II, Ang Ⅱ）AT1和AT2受体、血管紧张素转化酶、血管紧张素原均在小鼠胰岛中表达，实时RT-PCR、western blot和二重荧光染色更证实AT1R特定地在胰岛β细胞表达[6]。高血糖可以剂量依赖的方式上调胰岛RAS系统各组分表达，亦有动物实验结果证实糖尿病小鼠胰岛细胞AT1R表达水平明显升高[7-8]。本次实验结果与此一致，db/db小鼠胰岛AT1R mRNA及蛋白的表达水平显著升高，约为db/m小鼠的3倍左右。

胰岛β细胞AT1R表达对胰岛功能可能有重要影响。AT1R阻滞剂替米沙坦长期干预治疗可下调高质饮食下胰岛炎症因子IL-1β表达，降低转录因子NF-KB百分比，降低解偶联蛋白-2(UCP-2)诱导的氧化应激，减轻内质网应激，最终减缓β细胞凋亡进而





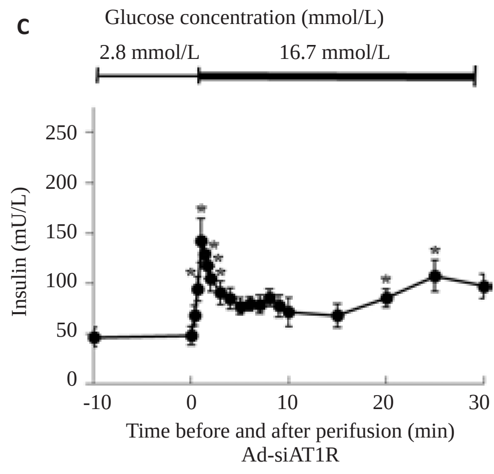


图5 各组体外胰岛的胰岛素分泌曲线

Fig.5 Insulin secretion curve of the islets in different groups. *P<0.05 *vs* Ad-siControl group.

改善胰岛素分泌[9]。洛沙坦可减轻AT1R诱导的磷脂酶C-三磷酸肌醇-Ca^{2+}信号通路对β细胞胰岛素分泌的损伤[10]。我们前期研究亦发现AT1R阻滞剂治疗能够改善胰岛局部血供，减轻胰岛内氧化应激，增加胰岛细胞数量并改善胰岛素第一相分泌[5, 11]。以上研究结果显示全身RAS阻断可不同程度保护胰岛分泌功能，但胰岛局部AT1R的表达对胰岛分泌功能有无直接调节作用尚不清楚。鉴于此，我们采用RNA干扰技术抑制离体db/db小鼠胰岛β细胞特异性AT1R表达，观察β细胞AT1R阻断后胰岛分泌功能有无变化。实验结果显示，腺病毒感染后Ad-siAT1R组AT1R表达水平显著降低，与此同时，第一相胰岛素分泌明显改善，峰值升高至140 mU/L，为基础水平的2.8倍，提示β细胞高表达的AT1R可直接损害胰岛素分泌功能。

但AT1R抑制β细胞胰岛素分泌的机制尚不清楚。有研究发现，AT II诱导的氧化应激可降低PI3K的活性，抑制其下游信号如AKT2介导的GLUTs的转运以及其他葡萄糖感受器的表达，减少胰岛素分泌[12]。GLUT2和GCK是β细胞最重要的葡萄糖感受器。血糖升高超过正常范围时GLUT2将葡萄糖转运至胰岛β细胞中，继而由GCK磷酸化进入糖酵解及氧化过程，结果使ATP/ADP的比值增加，细胞内K^+通道关闭，细胞膜去极化，Ca^{2+}通道开放，细胞内Ca^{2+}浓度增加，存储胰岛素的囊泡与质膜融合，胰岛素释放至胞外[13]。胰岛β细胞GLUT2、GCK表达水平与胰岛分泌功能密切相关，GCK表达缺陷的β细胞需要更高的血糖浓度刺激才能启动胰岛素分泌，恢复GCK表达后可逆转这一现象，上调胰岛β细胞GLUT2表达水平亦可显著改善β细胞胰岛素分泌功能[14-15]。为此我们观察了腺病毒感染前后胰岛细胞GLUT-2及GCK表达变化情况。结果显示，抑制胰岛β细胞AT1R表达后，GLUT-2及GCK表达水平明显升高，同时伴有第一相胰岛素分泌显著改善。因此我们推测，糖尿病状态下胰岛局部高浓度的Ang Ⅱ与β细胞过度表达的AT1R受体结合后，可通过降低GLUT-2及GCK表达水平，削弱胰岛β细胞第一相胰岛素分泌。

综上所述，本研究证实胰岛β细胞表达的AT1R与其胰岛素分泌功能密切相关，阻断β细胞AT1R可升高GLUT2和GCK的表达水平，显著改善胰岛素第一相分泌，这可能是AT1R拮抗剂改善胰岛分泌功能的机制之一。

参考文献:

[1] Ceriello A, Esposito K, Piconi L, et al. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients[J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1349-54.

[2] Hu Y, Liu W, Huang R, et al. Postchallenge plasma glucose excursions, carotid intima-media thickness, and risk factors for atherosclerosis in Chinese population with type 2 diabetes[J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 302-6.

[3] 邵加庆, 顾 萍, 杜 宏, 等. 替米沙坦对db/db小鼠胰岛内微血管结构的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2010, 12(8): 726-8.

[4] Kampf C, Lau T, Olsson R, et al. Angiotensin II type 1 receptor inhibition markedly improves the blood perfusion, oxygen tension and first phase of glucose-stimulated insulin secretion in revascularised syngeneic mouse islet grafts[J]. Diabetologia, 2005, 48(6): 1159-67.

[5] Shao J, Iwashita N, Ikeda F, et al. Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(4): 1224-33.

[6] Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas[J]. J Physiol, 2007, 580(Pt 1): 31-7.

[7] Härdtner C, Mörke C, Walther R, et al. High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic β-cells[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4): 795-804.

[8] Chu KY, Lau T, Carlsson PO, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2006, 55(2): 367-74.

[9] Yuan L, Li X, Li J, et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on the islet morphology and function in rats with long-term high-fat diet[J]. Acta Diabetol, 2013, 50(4): 479-88.

[10] Madec AM, Cassel R, Dubois S, et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway[J]. FASEB J, 2013, 27(12): 5122-30.

[11] Shao JQ, Iwashita N, Du H, et al. Angiotensin II receptor blocker provides pancreatic beta-cell protection Independent of blood pressure lowering in diabetic db/db mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(2): 246-57.

[12] Kasper SO, Phillips EE, Castle SM, et al. Blockade of the Renin-Angiotensin system improves insulin receptor signaling and insulin-stimulated skeletal muscle glucose transport in burn injury[J]. Shock, 2011, 35(1): 80-5.

[13] Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion[J]. Eur J Clin Invest, 2003, 33(9): 742-50.

[14] Hua H, Shang L, Martinez H, et al. iPSC-derived β cells model diabetes due to glucokinase deficiency[J]. J Clin Invest, 2013, 123(7): 3146-53.

[15] Gu J, Li W, Xiao D, et al. Compound K, a final intestinal metabolite of ginsenosides, enhances insulin secretion in MIN6 pancreatic β-cells by upregulation of GLUT2[J]. Fitoterapia, 2013, 87: 84-8.

（编辑:吴锦雅）